

IDENTIFIKASI ETANOL HASIL FERMENTASI SENTE (*Alocasia macrorrhiza* (L.)G.Don), SENTE WULUNG (*Alocasia indica* (Lour.) Koch) DAN KIMPUL (*Xhantosoma nigrum* (Vell.) Mansf)

Shella Diana Oktaviani, Sabikis, Dwi Hartanti

Fakultas Farmasi Universitas Muhammadiyah Purwokerto
Jl. Raya Dukuhwaluh Purwokerto 53182 PO. Box 202**ABSTRAK**

Sente, sente wulung dan kimpul banyak mengandung karbohidrat. Fermentasi sente, sente wulung dan kimpul dapat dijadikan salah satu alternatif bahan bakar nabati. Tujuan penelitian ini adalah produksi etanol secara fermentasi dengan bahan baku sente, sente wulung dan kimpul dan melakukan validasi metode identifikasi etanol secara spektrofotometri UV-Vis serta membandingkan kadar etanol yang dihasilkan masing-masing sampel. Penelitian ini menggunakan metode fermentasi anaerobik untuk menghasilkan etanol. Uji kualitatif terhadap hasil fermentasi sampel meliputi etanol, metanol, asetaldehid, aseton dan asam asetat. Kadar etanol hasil fermentasi ditetapkan secara spektrofotometri UV-Vis dengan mikrodifusi menggunakan alat cawan Conway. Metode spektrofotometri UV-Vis dilakukan validasi dengan mencari nilai presisi, akurasi, LOD, LOQ dan linieritas untuk memastikan identifikasi etanol dapat digunakan dalam menetapkan kadar hasil fermentasi sente, sente wulung dan kimpul. Penelitian ini menghasilkan etanol ditandai dengan uji kualitatif reaksi iodoform positif. Validasi spektrofotometri UV-Vis menyimpulkan metode ini valid digunakan untuk penetapan kadar etanol dengan alat cawan conway. Sente, sente wulung dan kimpul menghasilkan etanol yang sebanding.

Kata kunci : Fermentasi, cawan Conway, Etanol, Sente, Sente Wulung dan Kimpul.

ABSTRACT

Sente, sente wulung and kimpul contains carbohydrates. Fermentation of sente, sente wulung and kimpul can be used as an alternative biofuel. The purpose of this research are to produce the ethanol by fermentation from sente, sente wulung and kimpul, validate the identification methods of ethanol by UV-Vis Spectrophotometry and compare the levels of ethanol produced each sample. This study uses an anaerobic fermentation to produce ethanol. Qualitative test of results of fermentation are ethanol, methanol, acetaldehyde, acetone and acetic acid. Determination of ethanol content used UV-Vis Spectrophotometry instruments by microdiffusion with Conway dish. UV-Vis Spectrophotometric method is validated by finding the value of precision, accuracy, LOD, LOQ and linearity. The result will be used to ensure the identification of ethanol, and then determine fermentation levels of sente, sente wulung and kimpul. This research is producing ethanol marked by a positive iodoform reaction. Validation UV-Vis Spectrophotometry conclude this method is valid for determination of ethanol through Conway dish instrument. Sente, sente wulung and kimpul to produce ethanol equivalent.

Keywords: Fermentation, Conway dish, Ethanol, Sente, Sente Wulung dan Kimpul

PENDAHULUAN

A. Latar Belakang

Kenaikan harga minyak dunia memaksa pemerintah untuk menaikkan harga Bahan Bakar Minyak (BBM) dan ini sangat berpengaruh terhadap kehidupan masyarakat. Dengan meningkatnya harga BBM maka muncul kata baru Bahan Bakar Nabati (BBN). Berbeda dengan BBM dari fosil yang terbentuk dari tanaman dan hewan selama ratusan juta tahun, BBN lebih berbasiskan pada industri perkebunan dan pertanian (Kusumastuti, 2007)

BBN lebih menekankan pada budidaya energi (*energy farming*). *Energy farming* lebih mengedepankan pengumpulan dan penyimpanan energi matahari yang dapat diperbaharui dengan sendirinya (*self sustainable*) dan tidak merusak lingkungan karena tidak menyebabkan polusi. *Energy farming* berpikir tentang membudidayakan energi melalui tumbuhan hijau sehingga dikenal sebagai energi hijau (*Green energy*) (Kusumastuti, 2007).

Sebenarnya BBN bukan hal yang baru dalam kehidupan masyarakat hanya teknologinya yang berbeda. Salah satu contoh pemanfaatan BBN pada zaman

purba yaitu dengan membakar biji jarak untuk penerangan (Kusumastuti, 2007).

Etanol merupakan bahan kimia yang diproduksi dari bahan baku tanaman yang mengandung pati seperti ubi kayu, ubi jalar, jagung, sagu dan talas biasanya disebut dengan bioetanol. Ubi kayu, ubi jalar dan talas merupakan tanaman pangan yang biasa ditanam rakyat hampir di seluruh wilayah Indonesia, sehingga jenis tanaman tersebut merupakan tanaman yang potensial untuk dipertimbangkan sebagai sumber bahan baku pembuatan Bahan Bakar Nabati (BBN).

Produksi etanol/bioetanol (alkohol) dengan bahan baku tanaman yang mengandung pati atau karbohidrat, dilakukan melalui proses konversi karbohidrat menjadi gula (glukosa) larut air.

Proses fermentasi sering didefinisikan sebagai proses pemecahan karbohidrat dan asam amino secara anerobik, yaitu tanpa memerlukan oksigen. Senyawa yang dapat dipecah dalam proses fermentasi terutama adalah karbohidrat, sedangkan asam amino hanya dapat difermentasi oleh beberapa jenis bakteri tertentu (Fardiaz, 1992). Prinsip dasar fermentasi adalah mengaktifkan kegiatan mikroba

tertentu dengan tujuan mengubah sifat bahan agar dihasilkan suatu yang bermanfaat.

Sente (*Alocasia macrorrhiza*) dan Kimpul (*Xhantosoma nigrum*) merupakan jenis talas-talasan yang berpotensi menghasilkan etanol karena mengandung karbohidrat. Jenis-jenis sente yang umum di masyarakat adalah sente wulung dan sente hijau yang memiliki kandungan karbohidrat berbeda-beda sehingga kemungkinan menghasilkan kadar etanol berbeda-beda pula. Sedangkan jenis kimpul yang sering dijumpai adalah kimpul bertangkai hijau dan kimpul hitam (Anonim, 2008). Dengan adanya penelitian ini diharapkan masyarakat dapat memanfaatkan tanaman sente dan kimpul untuk diolah menghasilkan etanol.

Pada penelitian ini digunakan metode spektrofotometri UV-Vis. Spektrofotometri serap adalah pengukuran serapan radiasi elektromagnetik panjang gelombang tertentu yang sempit, mendekati monokromatik, yang diserap zat. Pengukuran serapan dapat dilakukan pada daerah ultraviolet (panjang gelombang 190-380 nm) atau pada daerah cahaya tampak (panjang gelombang 380-780 nm) (Anonim, 1979). Dari hal-hal tersebut di

atas maka dapat dirumuskan masalah sebagai berikut:

1. Apakah fermentasi sente, sente wulung dan kimpul dapat menghasilkan etanol?
2. Apakah identifikasi etanol hasil fermentasi secara Spektrofotometri UV-Vis valid?
3. Berapakah kadar etanol yang dihasilkan dari hasil fermentasi sente, sente wulung dan kimpul?

B. Tujuan Penelitian

1. Produksi etanol secara fermentasi dengan bahan baku sente, sente wulung dan kimpul.
2. Menetapkan validasi metode identifikasi etanol secara Spektrofotometri UV-Vis.
3. Membandingkan kadar etanol hasil fermentasi dari sente, sente wulung dan kimpul.

METODE PENELITIAN

A. Alat dan Bahan

1. Alat Penelitian

Alat yang digunakan adalah seperangkat alat Spektrofotometer Ultraviolet Visibel (Genesis 10S), seperangkat alat-alat gelas, neraca analitik elektrik C-200D (Inaba Susakusho), pipet volume, fermentor,

kompur listrik, panci, cawan Conway, botol timbang.

2. Bahan Penelitian

Pereaksi-pereaksi jika tidak disebut lain yang dimaksud adalah pereaksi murni E Merck (p.a). Bahan-bahan yang digunakan adalah :

Sente, sente wulung (diambil dari kebun desa Pamijen, Sokaraja) dan kimpul (diambil dari Purwokerto), ragi cap matahari (cakra), aquabidest (Bratacem), kalium bikromat, asam sulfat, kalium permanganat, asam asetat, NaOH, Iodium, etanol absolut, Na_2CO_3 , natrium nitroferisianida P, piperazina P, silicon grease, dinatrium pentasianonitrosilferat(II), asam fosfat, asam oksalat, larutan besi(III) klorida, HCl 3N.

B. Tempat Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Kimia Organik Farmasi Fakultas Farmasi Universitas Muhammadiyah Purwokerto dan Laboratorium Kimia Farmasi Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada Yogyakarta.

C. Batasan Variabel Operasional

1. Pengumpulan Sampel

Sampel dikumpulkan secara acak dari Sokaraja dan Purwokerto.

2. Variabel Penelitian

Variabel bebas : sampel tanaman yang digunakan sebagai substrat.

Variabel tergantung : kadar etanol yang dihasilkan

Variabel terkendali: larutan baku etanol, pelarut yang digunakan, metode penelitian, alat-alat yang digunakan, lama fermentasi, dan konsentrasi ragi yang ditambahkan.

D. Cara Kerja

1. Determinasi Sampel

Sampel dideterminasi di Laboratorium Taksonomi Tumbuhan Fakultas Biologi Universitas Jendral Soedirman.

2. Persiapan Sampel

Sebanyak 500 g sente, sente wulung dan kimpul dicuci terlebih dahulu dengan air sampai bersih, kemudian parut.

3. Proses Fermentasi

Fermentor yang digunakan dalam proses fermentasi dibuat dari botol berukuran 2,5 liter dengan tutup terbuat dari gabus yang bagian tengahnya dilubangi untuk menghubungkan selang ke dalam botol kecil berisi air untuk aerasi atau pembuangan CO_2 dan dibuat *sampagne*

knop. Dan tutup dioleskan dengan lilin agar tidak ada gelembung yang keluar. Untuk sampel, masing-masing sampel yang sudah diparut ditimbang 250 gram, tambahkan air 1200 mL, dimasak sampai matang dan dinginkan. Setelah dingin campur ragi dengan konsentrasi 5% dari jumlah sampel yang digunakan, yaitu 12,5 gram. Aduk hingga rata dan masukkan dalam fermentor, lakukan pemeraman selama 5 hari (Yap, 1989). Dari proses ini akan diperoleh cairan hasil fermentasi yang akan digunakan untuk uji kualitatif dan uji kuantitatif.

4. Pembuatan pereaksi penetapan kadar etanol secara Spektrofotometri UV-Vis

a. Larutan dikromat asam

Sebanyak 4,26 g dikromat ditambahkan sedikit demi sedikit dengan aquabides 100 mL hingga larut, lalu tambahkan asam sulfat 500 mL sedikit demi sedikit dan dinginkan.

b. Larutan Na_2CO_3 20%

Untuk membuat larutan Na_2CO_3 20% dengan mencampur 20 gram Na_2CO_3 dengan 100 mL aquabides hingga larut.

c. Larutan standar 0,5 g/dL

Menimbang etanol absolut dengan botol timbang sebanyak 0,5 g, tambahkan dengan aquabides hingga 100 mL.

d. Pembuatan pereaksi Schiff

100 g rosanilin klorida dilarutkan dalam 50 mL aquabides dengan cara dipanaskan. Setelah itu ditambahkan 1,25 g natrium sulfit dan 20 mL HCl 6 N.

5. Penentuan panjang gelombang maksimum

Larutan dikromat asam sebanyak 0,1 mL diencerkan hingga 10 mL dengan aquabides dalam labu takar. Lalu serapan kalium dikromat dibaca dengan Spektrofotometri UV-Vis pada panjang gelombang 400-800 nm.

1. Penentuan *operating time*

Bagian tengah cawan Conway diisi 3 mL dikromat asam, pipetkan bersebelahan pada bagian (lingkaran) luar cawan Conway 0,5 mL larutan standar (konsentrasi 0,5 g/dL) dan 1 mL Na_2CO_3 . Cawan ditutup dengan penutupnya yang telah diberi silicon grease, kemudian dikeram pada suhu 90°C selama 20 menit. Ambil larutan dikromat, masukkan dalam labu takar 25 mL. Bilas tempat tadi dua kali dengan aquabides dan masukkan hasil bilasan ke dalam labu, tambahkan aquabides sampai 25 mL. Kemudian dibaca serapannya pada menit 5, 10, 15, 20 sampai 25, dibaca pada panjang gelombang maksimum sampai diperoleh serapan yang stabil.

2. Pembuktian Hukum Lambert-Beer

Dibuat seri konsentrasi etanol 0,1; 0,2; 0,4; 0,6; 0,9 g/dL. Bagian tengah cawan Conway diisi 3 mL dikromat asam, pipetkan bersebelahan pada bagian (lingkaran) luar cawan Conway larutan standar dari masing-masing konsentrasi sebanyak 0,5 mL dan 1 mL Na_2CO_3 . Cawan ditutup dengan penutupnya yang telah diberi silicon grease, kemudian dikeram pada suhu 90°C selama 20 menit. Ambil larutan dikromat, masukkan dalam labu takar 25 mL. Bilas tempat tadi dua kali dengan aquabides dan masukkan hasil bilasan ke dalam labu, tambahkan aquabides sampai 25 mL.

Baca serapannya menggunakan Spektrofotometri UV-Vis pada panjang gelombang maksimum. Dari data hasil serapan, selanjutnya dihitung persamaan Lambert-Beer. Diperoleh persamaan garis

$$y = bx + a.$$

3. Validasi penetapan kadar etanol secara Spektrofotometri UV-Vis

a. Ketelitian (*precision*)

Bagian tengah cawan Conway diisi 3 mL dikromat asam, pipetkan bersebelahan pada bagian (lingkaran) luar cawan Conway 0,5 mL larutan standar 0,1 g/dL dan 1 mL Na_2CO_3 . Cawan ditutup dengan

penutupnya yang telah diberi silicon grease, kemudian dikeram pada suhu 90°C selama 20 menit. Ambil larutan dikromat, masukkan dalam labu takar 25 mL. Bilas tempat tadi dua kali dengan aquabides dan masukkan hasil bilasan kedalam labu, tambahkan aquabides sampai 25 mL. Diamkan selama waktu *operating time* kemudian diukur serapannya pada panjang gelombang maksimum, kemudian diulangi sebanyak enam kali.

b. Linieritas (*linearity*)

Bagian tengah cawan Conway diisi 3 mL dikromat asam, pipetkan bersebelahan pada bagian (lingkaran) luar cawan Conway larutan standar dari konsentrasi 0,1; 0,2; 0,4; 0,6; 0,9 g/dL sebanyak 0,5 mL dan 1 mL Na_2CO_3 . Cawan ditutup dengan penutupnya yang telah diberi silicon grease, kemudian dikeram pada suhu 90°C selama 20 menit. Ambil larutan dikromat, masukkan dalam labu takar 25 mL. Bilas tempat tadi dua kali dengan aquabides dan masukkan hasil bilasan kedalam labu, tambahkan aquabides sampai 25 mL. Diamkan selama waktu *operating time* kemudian diukur serapannya pada panjang gelombang maksimum, Hasil serapan digunakan untuk membuat kurva baku dan dapat diperoleh harga koefisien korelasinya sehingga dapat ditentukan

linieritasnya bagus atau tidak. Persamaan garis linieritasnya yaitu $y = bx + a$ yang nantinya juga dapat digunakan untuk menghitung harga batas deteksi dan batas kuantitasi. Hubungan linier yang ideal dicapai jika $r = + 1$ atau $- 1$ bergantung pada arah garis (Harmita, 2004:129).

c. Batas deteksi dan batas kuantitasi (LOD & LOQ)

Batas deteksi dan batas kuantitasi dengan metode Spektrofotometri UV-Vis dapat dihitung secara statistik melalui garis linier dari kurva baku. Nilai pengukuran akan sama dengan b pada persamaan garis linier $y = a + bx$, sedangkan simpangan baku blanko sama dengan simpangan bakuresidual (Sy/x).

$$\text{Batas deteksi (LOD)} = \frac{3 Sy/x}{Sl}$$

$$\text{Batas kuantitasi (LOQ)} = \frac{10 Sy/x}{Sl}$$

Sy/x = simpangan baku respon analitik dari blanko

Sl = arah garis linier (kepekaan arah kurva) dari kurva antara respon terhadap konsentrasi = slope (b dari persamaan garis linier).

(Harmita, 2004).

d. Ketepatan (*accuracy*)

Akurasi dilakukan dengan metode penambahan baku. Sampel dianalisis, lalu

sejumlah tertentu analit yang diperiksa ditambahkan ke dalam sampel, dicampur dan dianalisis lagi (Harmita, 2004: 118). Diambil sampel cairan fermentasi secara duplo. Pada salah satu penimbangan secara duplo ditambahkan larutan baku etanol sebanyak 0,2 mL dengan konsentrasi 0,5 g/dL. Sediakan 2 cawan Conway dengan tutupnya. Bagian tengah cawan Conway diisi 3 mL dikromat asam, pipetkan bersebelahan pada bagian (lingkaran) luar cawan Conway 0,5 mL larutan sampel dan 1 mL Na_2CO_3 . Cawan ditutup dengan penutupnya yang telah diberi silicon grease, kemudian dikeram pada suhu 90°C selama 20 menit. Ambil larutan dikromat, masukkan dalam labu takar 25 mL. Bilas tempat tadi dua kali dengan aquabides dan masukkan hasil bilasan kedalam labu, tambahkan aquabides sampai 25 mL. Diamkan selama waktu *operating time* kemudian diukur serapannya pada panjang gelombang maksimum. Dilakukan sama terhadap 0,3 mL sampel yang ditambah larutan standar 0,5 g/dL sebanyak 0,2 mL. Hasil serapan digunakan untuk menghitung harga perolehan kembali (*recovery*).

Nilai *recovery* dapat dihitung dengan rumus:

$$\text{recovery} = \left(\frac{\text{kadar terukur}}{\text{kadar teoritis}} \right) \times 100\%$$

4. Uji kualitatif hasil fermentasi sampel

Uji kualitatif dilakukan untuk mengetahui ada tidaknya etanol, yaitu:

a. Etanol

- Reaksi iodoform : pada 5 mL larutan (1 dalam 10) tambahkan 1 mL NaOH 1N dan perlahan-lahan (setelah 3 menit) tambahkan 2 mL iodum 0,1N : timbul bau iodoform dan terbentuk endapan kuning dalam waktu 30 menit jika terdapat etanol.

- Campur 5 tetes sampel dalam gelas piala dengan 1 mL larutan kalium permanganat P (1 dalam 10) 5 tetes asam sulfat 2N, tutup gelas piala dengan kertas saring yang dibasahi dengan larutan segar 100 mg natrium nitroferisianida P dan 250 mg piperazina P dalam 5 mL air, terjadi warna biru intensif pada kertas saring, warna akan memucat setelah beberapa menit (Anonim, 1995) .

b. Aseton

5 mL cairan sampel ditambahkan 1 mL larutan dinatrium pentasianonitrosilferat (II) 2,5% dan 0,5 mL NaOH 3N. jika reaksi positif, akan terbentuk warna merah cokelat. Setelah diasamkan dengan CH₃COOH 6N warna tersebut menjadi ungu (percobaan legal) (Yap, 1989).

c. Metanol

Sejumlah 0,2 mL larutan sampel direaksikan dengan 5 mL larutan kalium permanganat 1% dan 0,5 mL asam fosfat, 15 menit kemudian ditambahkan 2 mL larutan asam oksalat 5% dalam asam sulfat 50%. Sesudah ditambahkan pereaksi Schiff, jika ada metanol maka akan terbentuk warna merah (Yap, 1989).

d. Asam asetat

Campuran 1 mL sampel dan 5 mL NaOH 3N direaksikan dengan 1 mL larutan besi (III) klorida 10%. Jika positif ada asam asetat, maka akan terbentuk warna merah (Yap, 1989).

e. Asetaldehid

Sampel dilarutkan dalam aquabides, diasamkan dengan HCl 3N lalu ditambahkan pereaksi Schiff dengan volume sama banyak. Setelah beberapa waktu, jika ada asetaldehid maka akan terbentuk warna merah sampai ungu (Yap, 1989).

5. Uji kuantitatif kadar etanol hasil fermentasi

Uji kuantitatif dilakukan untuk mengetahui berapa kadar etanol dalam sampel yang digunakan dan dapat membandingkan kadar sampel satu dengan lainnya. Pada penetapan kadar etanol dibuat dahulu blanko dan

standarnya. Untuk blanko, sebanyak 3 mL larutan asam dikromat tambahkan aquabides sampai 25 mL dalam labu, baca serapan pada panjang gelombang maksimum. Sedangkan standar, bagian tengah cawan Conway diisi 3 mL dikromat asam, pipetkan bersebelahan pada bagian (lingkaran) luar cawan Conway 0,5 mL larutan standar dari konsentrasi 0,5 g/dL dan 1 mL Na_2CO_3 . Cawan ditutup dengan penutupnya yang telah diberi silicon grease, kemudian dikeram pada suhu 90°C selama 20 menit. Ambil larutan dikromat, masukkan dalam labu takar 25 mL. Bilas tempat tadi dua kali dengan aquabides dan masukkan hasil bilasan kedalam labu, tambahkan aquabides sampai 25 mL. Baca serapan pada panjang gelombang maksimum.

Untuk penetapan kadar pada sampel, dilakukan dengan menyediakan 3 cawan Conway dengan tutupnya. Bagian tengah cawan Conway diisi 3 mL dikromat asam, pipetkan bersebelahan pada bagian (lingkaran) luar cawan Conway 0,5 mL larutan sampel dan 1 mL Na_2CO_3 . Cawan ditutup dengan penutupnya yang telah diberi silicon grease, kemudian dikeram pada suhu 90°C selama 20 menit. Ambil larutan dikromat, masukkan dalam labu takar 25 mL. Bilas tempat tadi dua kali

dengan aquabides dan masukkan hasil bilasan kedalam labu, tambahkan aquabides sampai 25 mL. Baca serapan pada panjang gelombang maksimum.

6. Analisis data

Dari data hasil penetapan kadar yang diperoleh diuji homogenitas untuk mengetahui data tersebut homogen dan layak untuk diuji statistik selanjutnya atau tidak. Dalam uji homogenitas metode yang digunakan adalah varian terbesar dibanding varian terkecil, dengan taraf signifikan (α) = 0,05. Jika data tersebut homogen maka dilanjutkan uji secara statistik dengan analisis variansi (ANOVA) taraf kepercayaan 95%. Hal ini digunakan untuk mengetahui perbedaan yang terjadi pada semua sampel. Apabila ada perbedaan yang bermakna maka dilanjutkan dengan uji BNT.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Setelah dilakukan penelitian, maka didapatkan hasil dan pembahasan sebagai berikut :

1. Determinasi sampel

Sampel yang dideterminasi adalah sente, sente wulung dan kimpul. Determinasi dilakukan di Laboratorium Taksonomi Fakultas Biologi Universitas Jenderal Soedirman. Dalam determinasi sampel digunakan buku Flora of Java Vol. III

(Backer & Bakhuizen Van Den Brink, 1968). Hasil dari determinasi menyatakan bahwa sampel yang akan digunakan untuk penelitian adalah benar, yaitu *Alocasia macrorrhiza* (L.) G.Don (sente hijau), *Alocasia indica* (Lour.)Koch (sente hitam) dan *Xanthosoma nigrum* (Vell.)Mansf (Kimpul hitam).Hasil dapat dilihat pada lampiran 1.

2. Persiapan sampel

Sente dan sente wulung diperoleh di kebun desa Pamijen Sokaraja sedangkan kimpul diperoleh di Purwokerto.Untuk persiapan, sebanyak 500 g sente, sente wulung dan kimpul dicuci terlebih dahulu bagian bonggolnya dengan air bersih kemudian diparut. Sebelum digunakan untuk proses fermentasi, sampel yang telah diparut di uji dengan meneteskan iodium untuk mengetahui adanya amilum. Dari ketiga sampel menunjukkan warna biru yang artinya sampel tersebut mengandung amilum.Sampel yang paling pekat warna birunya berturut-turut adalah kimpul, sente wulung dan sente.Gambar dapat dilihat pada lampiran 2.Hal ini menunjukkan bahwa sampel yang paling banyak mengandung amilum berturut-turut adalah kimpul, sente wulung dan sente.

3. Proses fermentasi

Pada proses fermentasi, sampel dimasak dahulu dengan air untuk memecah amilum, setelah itu ditambah ragi sebanyak 5% dari jumlah sampel yang digunakan, yaitu 12,5 g. Ragi yang digunakan adalah *Saccharomyces cerevisiae*.

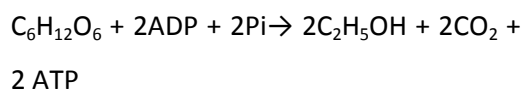
Sebelum ditambahkan dalam sampel, ragi dihancurkan dahulu hingga menjadi serbuk, lalu buat suspensi dengan menambahkan aquabides, tujuannya agar ragi mudah merata pada sampel saat dicampur.Ragi ditambahkan setelah sampel dingin, karena *Saccharomyces cerevisiae* aktif melakukan aktifitasnya pada suhu 4-32°C (Kartika et. al, 1992).

Saccharomyces cerevisiae merupakan mikroorganisme yang paling banyak digunakan pada fermentasi alkohol karena dapat berproduksi tinggi, tahan terhadap kadar alkohol yang tinggi, tahan terhadap kadar gula yang tinggi (Kartika et. al, 1992). Jumlah penambahan ragi berdasarkan penelitian sebelumnya.

Ragi tersebut akan mengubah amilum menjadi gula yang lebih sederhana yaitu glukosa, kemudian glukosa akan dipecah oleh *Saccharomyces cerevisiae* menjadi etanol. Proses fermentasi dilakukan selama 5 hari ditempat yang gelap. Selama

proses fermentasi dilakukan penggojogan supaya homogen antara air, sampel dan ragi, sehingga tidak terjadi proses fermentasi setempat. Namun karena di Laboratorium Kimia Organik tidak ada alat magnetik stirer, maka penggojogan dilakukan dengan menggoyangkan fermentor. Penggojogan hanya dilakukan dalam waktu tertentu, dan dengan kekuatan yang berbeda pada tiap sampel. Hal ini menyebabkan proses fermentasi yang kurang maksimum dan etanol yang dihasilkan oleh masing-masing sampel berbeda.

Sampel difermentasi dengan ragi untuk menguraikan gula menjadi alkohol dan karbondioksida yang disebabkan aktivitas sel-sel khamir yang tumbuh dan berkembang biak dalam cairan hasil fermentasi tanpa suplai udara (anaerobik). Selama proses fermentasi berlangsung, khamir membutuhkan cadangan energi agar ia mampu bertahan hidup berupa Adenosin Tri Phosphat (ATP) yang diperoleh dari :



Proses fermentasi dikatakan berjalan baik apabila terdapat gelembung didalam botol kecil yang berisi air. Pada proses fermentasi yang dilakukan, gelembung

hanya keluar jika digojog. Hal ini terjadi karena alat fermentor yang terlalu besar sehingga gas hasil fermentasi tidak dapat menekan ke atas.

Dari proses ini diperoleh cairan hasil fermentasi dan akan digunakan untuk uji kualitatif dan uji kuantitatif.

4. Pembuatan pereaksi penetapan kadar etanol secara Spektrofotometri UV-Vis

a. Larutan dikromat asam

Sebanyak 4,26 g dikromat ditambahkan sedikit demi sedikit dengan aquabides 100 mL hingga larut, lalu tambahkan asam sulfat 500 mL sedikit demi sedikit dan dinginkan. Larutan kalium dikromat asam adalah larutan antara kalium dikromat direaksikan dengan asam sulfat pekat. Warna larutan ini adalah orange tua.

Larutan kalium dikromat asam berfungsi sebagai oksidator yang akan mengoksidasi etanol menjadi asetat yang ditandai dengan warna hijau.

b. Larutan Na_2CO_3 20%

Untuk membuat larutan Na_2CO_3 20% dengan mencampur 20 gram Na_2CO_3 dengan 100 mL aquabides hingga larut. Warna larutan ini adalah putih bening. Larutan $NaCO_3$ berfungsi sebagai pembebas etanol dari larutan sampel, sehingga yang dibebaskan dapat bereaksi dengan dikromat asam.

c. Larutan standar 0,5 g/dL

Menimbang etanol absolut dengan botol timbang sebanyak 0,5 g, tambahkan dengan aquabides hingga 100 mL. Standar ini bewarna putih bening dan encer serta memiliki bau yang khas. Larutan standar adalah larutan yang digunakan sebagai pembanding terhadap sampel.

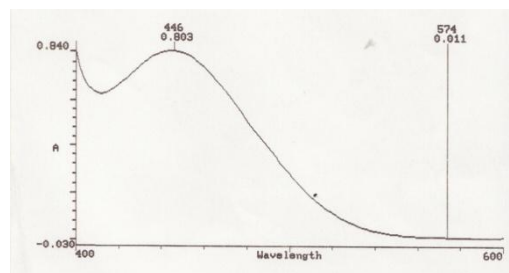
d. Pembuatan pereaksi Schiff

100 g rosanilin klorida dilarutkan dalam 50 mL aquabides dengan cara dipanaskan. Setelah itu ditambahkan 1,25 g natrium sulfit dan 20 mL HCl 6 N. Rosanilin bewarna merah dan berfungsi sebagai pereaksi.

5. Penentuan panjang gelombang maksimum

Optimasi panjang gelombang dimaksudkan untuk menentukan panjang gelombang maksimum sampel sehingga dapat memberikan serapan yang maksimum pula. Optimasi dilakukan pada daerah visibel, yaitu antara 400 – 800 nm.

Diperoleh panjang gelombang maksimum sebesar 446 nm yang merupakan puncak tertinggi dengan serapan sebesar 0,803 nm. Karena pada panjang gelombang maksimal tersebut perubahan serapan untuk setiap satuan konsentrasi adalah yang paling besar.



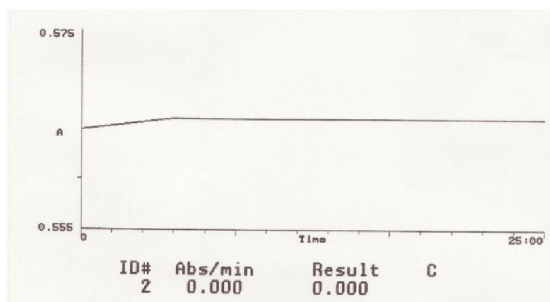
Gambar 1. Scanning panjang gelombang maksimum larutan dikromat asam.

6. Penentuan *operating time*

Tujuan ditetapkannya *operating time* adalah untuk mengetahui pada menit beberapa reaksi stabil dan ditandai dengan angka serapan yang konstan. Pembuatan *operating time* dari larutan standar 0,5 g/dL pada menit ke 5, 10, 15, 20 dan 25. Serapan yang stabil pada menit ke 15 yaitu 0,566. Hasil ini menunjukkan bahwa semua pengukuran serapan harus dilakukan pada waktu menit ke 15 dari proses perlakuan. *Operating time* digunakan sebagai acuan waktu untuk mereaksikan sampel sebelum dibaca serapannya di Spetrofotometri UV-Vis.

Table 1. Hubungan waktu dengan serapan sisa dikromat asam yang bereaksi dengan larutan standar 0,5 g/dL

Waktu (menit)	Serapan
5	0,565
10	0,566
15	0,566
20	0,566
25	0,566



Gambar 2. Grafik hubungan waktu (menit) dan serapan sisa dikromat asam yang bereaksi dengan larutan standar 0,5 g/dL.

Dari data tersebut menunjukkan etanol mencapai serapan yang konstan pada menit ke 10 sampai 25. Sehingga untuk prosedur selanjutnya pengukuran serapan dilakukan setelah 15 menit.

7. Pembuktian Hukum Lambert-Beer

Untuk pembuktian Hukum Lambert-Beer dibuat dari larutan etanol dengan seri konsentrasi 0,1; 0,2; 0,4; 0,6 dan 0,9 g/dL, dan dibaca serapannya dengan spektrofotometri UV-Vis pada panjang gelombang 446 nm.

Tabel 2 Data serapan sisa dikromat asam yang bereaksi dengan etanol dari seri konsentrasi etanol

Konsentrasi(g/dL)	Serapan
0,1	0,710
0,2	0,679
0,4	0,593
0,6	0,521
0,9	0,415

Hubungan antara serapan dengan kadar diperoleh persamaan Lambert-Beer yaitu, $y = -0,3733x + 0,7478$ dengan nilai r sebesar $-0,9993$.

8. Validasi penetapan kadar etanol secara Spektrofotometri UV-Vis

a. Ketelitian (*precision*)

Tujuan dari uji ini adalah untuk membuktikan ketelitian suatu metode berdasarkan tingkat keakuratan individual hasil analisis yang ditunjukkan dari harga *standart deviation*, *relative standart deviation* (RSD) dan ketelitian alat.

Tabel 3. Data hasil serapan dikromat asam sisa reaksi dengan etanol uji presisi alat

Ulangan	Serapan
1	0,765
2	0,772
3	0,767
4	0,771
5	0,773
6	0,774
Serapan rata-rata 0,770	
SD $3,578 \times 10^{-3}$	
%KV 0,465%	
Ketelitian alat 99,54%	

Dari hasil perhitungan pada uji presisi ini diperoleh serapan rata-rata 0,770 dan nilai SD sebesar $3,578 \times 10^{-3}$.

Standart deviation dikatakan baik apabila nilai $SD < 2$ (Mulja & Suharman, 1995). Pada tabel menunjukkan nilai KV sebesar 0,465%.

Ketelitian alat sebesar 99,54%, ketelitian alat dikatakan baik apabila nilai $RSD < 2\%$ (Harmita, 2004: 122). Nilai tersebut menunjukkan bahwa metode yang digunakan mempunyai harga ketelitian

yang cukup baik sehingga metode ini layak digunakan dalam analisis penetapan kadar etanol.

b. Linieritas (*linearity*)

Dari data kurva baku yang diperoleh dapat ditentukan nilai koefisien korelasinya sebesar -0,9993 dengan harga intersep (a) 0,7478 dan slope (b) -0,3733. Nilai koefisien korelasi hitung sebesar -0,9993 dari data yang diperoleh, dekat dengan garis regresi. Dimana nilai r dekat dengan 1 (atau -1) maka data yang diperoleh mendekati garis regresi (Pollet dan Nasrullah, 1994: 49).

c. Batas deteksi dan batas kuantitasi (LOD & LOQ)

Limit deteksi digunakan untuk mengetahui jumlah terkecil analit dalam sampel yang dapat terdeteksi yang masih memberikan respon signifikan. Limit kuantitasi digunakan untuk mengetahui jumlah terkecil analit dalam sampel yang masih dapat memenuhi kriteria cermat dan seksama (Harmita, 2004: 130). Diperoleh nilai limit deteksi sebesar 0,0367 g/dL dan nilai limit kuantitasi 0,1223 g/dL. Hal ini menunjukkan bahwa jumlah analit terkecil dalam sampel yang masih dapat dideteksi menggunakan metode Spektrofotometri UV-Vis adalah 0,0367 g/dL, sedangkan jumlah terkecil analit dalam sampel yang

masih dapat memenuhi kriteria cermat dan seksama adalah 0,1223 g/dL.

d. Ketepatan (*accuracy*)

Uji akurasi digunakan untuk membuktikan kedekatan antara hasil analisis dengan nilai sebenarnya.

Ketepatan dinyatakan sebagai persen perolehan kembali (*recovery*) analit yang ditambahkan. Ketepatan ditentukan dengan dua cara, yaitu metode simulasi dan metode penambahan baku (Harmita, 2004: 117). Pada uji akurasi digunakan metode adisi.

Harga *recovery* rata-rata yang diperoleh untuk sampel kimpul adalah 93,6%. Harga ini dapat diterima karena masuk dalam rentang yang diterima yaitu 80%-120% (Mulja & Suharman, 1995: 6).

Selain untuk mencari nilai *recovery*, menurut Mulja & Suharman (1995: 6) hasil serapan uji akurasi juga digunakan untuk menghitung kesalahan sistemik. Kesalahan sistemik merupakan tolak ukur inakurasi penetapan kadar. Persyaratan suatu metode yang mempunyai nilai *recovery* tinggi adalah hasil kesalahan sistemik kurang dari 10% (Mulja & Suharman, 1995).

Diperoleh nilai kesalahan sistemik untuk sampel kimpul adalah 6,4%, hasil yang diperoleh ini dapat diterima.

Uji kualitatif hasil fermentasi sampel

Uji kualitatif dilakukan untuk mengetahui senyawa apa saja yang dihasilkan pada proses fermentasi. Seperti yang terlihat pada tabel 5 dan gambar 10, senyawa yang terkandung dalam cairan hasil fermentasi hanya etanol, yang ditunjukkan dengan adanya endapan kuning dan bau iodoform.

Tabel 4. Hasil uji kualitatif cairan hasil fermentasi

Sampel	Eta nol	Aset on	Met anol	As. aset at	Asetal dehid a
Sente wulung	√	-	-	-	-
Sente	√	-	-	-	-
Kimpul	√	-	-	-	-

Keterangan :

√ : terdapat dalam cairan hasil fermentasi

- : tidak terdapat dalam cairan hasil fermentasi

-

Etanol merupakan bahan kimia yang diproduksi dari bahan baku tanaman yang mengandung pati. Produksi etanol dengan bahan baku tanaman yang mengandung pati, dilakukan melalui proses konversi karbohidrat menjadi gula larut air. Pada penelitian ini, sampel yang digunakan mengandung karbohidrat, sehingga dapat

menghasilkan etanol pada proses fermentasi dengan ragi.

Metanol dan aseton sangat tidak diharapkan terdapat dalam cairan hasil fermentasi. Metanol bersifat racun bagi tubuh, dapat mengakibatkan kebutaan dan kematian. Metanol dapat terbentuk karena adanya mikroba pembentuk enzim yang berperan dalam hidrolisis pektin bagi ragi. Aseton terbentuk karena adanya kontaminasi *Clostridium* yang dalam suasana anaerob dapat merubah asam piruvat yang terbentuk selama proses fermentasi melalui asetil Ko-A.

Asetaldehida merupakan senyawa yang terbentuk sebelum terbentuknya etanol pada proses fermentasi. Dalam cairan hasil fermentasi umbi sente dan kimpul tidak terdapat asetaldehida karena asetaldehid yang terbentuk langsung direduksi oleh $\text{NADH} + \text{H}^+$ menjadi etanol dan NAD^+ . Asam asetat juga tidak terdapat dalam cairan hasil fermentasi sampel. Asam asetat dapat terjadi dari dismutasi asetaldehid atau mungkin terbentuk dari asam piruvat.

9. Uji kuantitatif kadar etanol hasil fermentasi

Uji kuantitatif dilakukan untuk mengetahui berapa kadar etanol dalam sampel yang digunakan dan dapat

membandingkan kadar sampel satu dengan lainnya. Pada uji kuantitatif dilakukan dengan metode Spektrofotometri UV-Vis dengan cawan Conway.

Etanol merupakan bahan kimia yang diproduksi dari bahan baku tanaman yang mengandung pati. Produksi etanol dilakukan melalui proses konversi karbohidrat menjadi gula larut air. Sente, sente wulung dan kimpul yang digunakan sebagai sampel dalam penelitian ini untuk ditetapkan kadar etanolnya. Sampel tersebut mengandung pati yang membutuhkan suatu katalisator agar dapat dipecah menjadi glukosa yang kemudian dihidrolisis menjadi etanol.

Metode yang digunakan dalam penetapan kadar etanol ini adalah Spektrofotometri UV-Vis dengan cawan Conway. Dibutuhkan bahan berupa dikromat asam (kalium dikromat + asam sulfat) sebagai oksidator, natrium karbonat sebagai pembebas etanol, etanol absolut sebagai standar (pembanding) dan cairan hasil fermentasi sebagai sampel yang akan diperiksa.

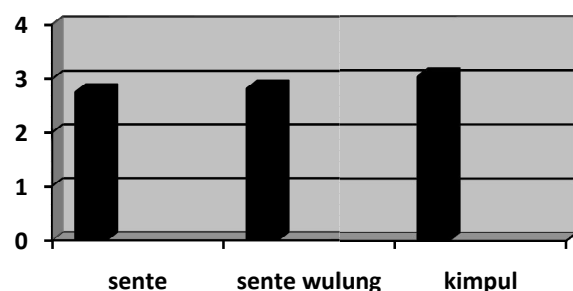
Prinsip kerja dalam cawan Conway adalah mikrodifusi, dimana saat dikeram pada suhu 90°C selama 20 menit, etanol akan menguap (TD etanol 78°C). Uap dari

etanol tersebut akan ditangkap oleh dikromat asam sehingga akan bereaksi antara dikromat asam dan etanol. Berkurangnya warna dikromat asam sebanding dengan kadar etanol yang dihasilkan. Semakin berkurangnya warna, semakin tinggi jumlah etanolnya.

Setelah etanol dalam sampel bereaksi dengan dikromat asam, larutan yang berada ditengah cawan diukur serapannya.yang diukur dengan Spektrofotometri adalah dikromat asam sisa, karena etanol tidak dapat dibaca serapannya dengan Spektrofotometri UV-Vis.

Data serapan yang didapat, dihitung kadar etanolnya dengan rumus :

$$Cu = \frac{Ab - Au}{Ab - As} \times Cs$$



Gambar 3. Grafik kadar etanol (g/dL) hasil fermentasi.

Hasil dari perhitungan kadar etanol, diperoleh rata-rata kadar untuk sente, sente wulung dan kimpul berturut-turut adalah 2,752%, 2,819% dan 3,037%.. Dari perhitungan kadar selanjutnya dianalisis variansi (anava) untuk mengetahui ada tidaknya perbedaan kadar etanol masing-masing sampel secara bermakna. Sebelum dilakukan anava, dilakukan terlebih dahulu uji homogenitas untuk mengetahui apakah data yang akan diolah homogen dan layak untuk dilakukan uji selanjutnya atau tidak. Pada tabel distribusi F didapat $F_{tabel} = 19,00$. Dari perhitungan uji homogenitas, $F_{hitung} \leq F_{tabel}$, yaitu $1,211 \leq 19,00$, artinya data yang digunakan adalah homogen dan dapat dilakukan uji anava.

Dari perhitungan anava, antara sente wulung, sente dan kimpul menghasilkan kadar etanol yang sebanding, karena F_{hitung} lebih kecil dari F_{tabel} , yaitu $16,875 < 19,33$, sehingga tidak dilanjutkan dengan uji BNT. Kandungan karbohidrat dalam sente adalah 64%, sedangkan kimpul adalah 98% (Anonim, 2006).

Namun kadar etanol yang dihasilkan dari masing-masing sampel sebanding, hal ini dapat disebabkan karena umur tanaman saat diambil sama-sama masih muda,

sehingga kandungan karbohidrat dalam sampel tidak berbeda jauh.

KESIMPULAN

1. Fermentasi sente, sente wulung dan kimpul dengan ragi dapat menghasilkan etanol.
2. Metode identifikasi etanol secara Spektrofotometri UV-Vis adalah valid.
3. Sente, sente wulung dan kimpul menghasilkan etanol yang sebanding

DAFTAR PUSTAKA

- Anonim.1979. *Farmakope Indonesia edisi III*. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia.
- Anonim.1995. *Farmakope Indonesia edisi IV*. Jakarta: Departemen 37 Kesehatan Republik Indonesia.
- Anonim. 2008. *Klasifikasi Sente*. <http://www.plantamor.com/index.php?plant=64>. Diakses tahun 2010.
- Anonim.2008. *Tanaman Obat*. <http://tanamanobat.org/475/kimpul/>. Diakses tahun 2010.
- Anonim. 2006. *Kandungan Gizi*. http://azaima.tripod.com/kandungan_gizi/id2.html. Diakses tahun 2010.
- Backer CA, Van den Brink RCB. 1968. *Flora of Java*. Vol III. Wolters Noordhoff, N. V Groningen. The Netherlands.

- Day & Underwood. 1994. *Kimia Analisis Kuantitatif Anorganik*. Jakarta;EGC.
- Fardiaz, S. 1992. *Mikrobiologi Pangan I*. Gramedia Pustaka Utama. Jakarta.
- Frazier, W. C dan W. C. Westhoff. 1978. *Food Microbiology*. New Delhi, India : Mc Graw Hill Publishing Co. Ltd
- Harmita, 2004.*Petunjuk Pelaksanaan Validasi Metode dan Cara Perhitungannya*. Jakarta. Departemen Farmasi FMIPA-UI.
- Jamil, Musanif. 2008. *Bio- Etanol*. http://www.kalamsalman.org/html/modulfile.php?page=YXJ0aWtlbA=&Aartikel_id=1.
- Judoamidjojo, M., A.A. Darwis, dan E. G. Sa'id. 1992. *Teknologi Fermentasi*. Edisi I Cetakan I. Rajawali Press. Jakarta.
- Kuswanto, Kapti Rahayu.1986. *Pembuatan Brem Padat dari Beberapa Bahan Berpati,laporan penelitian proyek PPT-UGM, 5, 7, 8*. Yogyakarta;Fakultas Teknologi Pertanian UGM.
- Kartika, B.,A.D. Guritno, D. Purwadi, D. Ismoyowati. 1992. *Petunjuk Evaluasi Produk Industri Hasil Pertanian*. PAU Pangan dan Gizi. Yogyakarta: UGM.
- Khopkar SM. 2008. *Konsep Dasar Kimia Analitik*. Jakarta; UI Press.
- Kusumastuti, Tri C. 2007. *Singkong Sebagai Salah Satu Sumber Bahan Bakar Nabati*. Yogyakarta: Fakultas Pertanian, Universitas Gadjah Mada.
- Laila, Siti dan Bagod Sudjadi.2007.*BIOLOGI Sains dalam Kehidupan*. Yudhistira Ghalia. Indonesia.
- Liesbetini, Hartono dan Ibrahim Sastramihardja. 1987. *Pembuatan Etanol Dengan Immobilized Cell Saccharomyces cerevisiae Dan Bahan Baku Molase Di Reaktor Unggun Terfluidakan*.Naskah Seminar Teknologi Fermentasi.PAU Bioteknologi ITB. Bandung.
- Mulja, M., and Suharman. 1995. *Analisis Instrumental*. Surabaya. Airlangga University Press.
- Pollet , A., dan Nasrullah .1994. *Penggunaan Metode statistik untuk ilmu Hayat*.Yogyakarta : Universitas Gajah Mada Press.p. 49
- Sastrohamidjojo, H. 2007. *Spektroskopi*.Yogyakarta : Liberty. Hal.64-72.
- Stark, W. H. 1954. *Alcoholic Fermentation Of Grain*, dalam: Industrial Fermentation, L. A. Underkofler dan R. J. Hickey (ed), volume 9, Chemical Publishing Co INC, New York.
- Stolman, A. 1960.*Toxicology Mechanisms and Analytical Methods*.New York and London: Academic Press.
- Widayati, E. dan Y. Widalestari. 1996. *Limbah Untuk Pakan Ternak* PT. Trubus Agrisarana. Surabaya.
- Widia, Sri. et al. 2001. *Biokimia Eksperimen Laboratorium*. Jakarta: Widya Medika.
- Wirahadikusumah, M. 1985. *Biokimia, Metabolisme Energi*,

Karbohidrat, dan Lipid. Bandung:
Penerbit ITB.

Yap, Y. Y. 1989. *Isolasi dan Identifikasi Alkohol Hasil Fermentasi Ketan Hitam, Ketan Putih (Oryza sativa var. glutinosa), Beras Merah, Beras Putih (Oryza sativa L.)* Skripsi. Yogyakarta: UGM.

